

REIVINDICACIONES

Tras haber descrito e ilustrado la naturaleza y objeto principal de la presente invención, así como también la manera en que la misma se puede llevar a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una levadura aislada, no modificada genéticamente, caracterizada porque expresa una asparaginasa asociada a la pared celular y tiene actividad reductora de la asparagina bajo condiciones no inductoras.

2. La levadura aislada, no modificada genéticamente, de la reivindicación 1, caracterizada porque la asparaginasa asociada a la pared celular es expresada en forma constitutiva.

3. La levadura aislada, no modificada genéticamente, de la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la levadura reduce la asparagina en al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% o más, cuando se cultiva bajo condiciones no inductoras.

4. La levadura aislada, no modificada genéticamente, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la asparaginasa asociada a la pared celular es codificada por el locus *ASP3*.

5. Un método para aislar una cepa de levadura que degrada L-asparagina bajo condiciones no inductoras, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) subcultivar una cepa de levadura de tipo natural, la cual expresa o tiene la capacidad de expresar una asparaginasa asociada a

la pared celular, en presencia de medios que contienen D-asparagina como la única fuente de nitrógeno;

b) subcultivar en forma continua, realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento, y someter a mutagénesis en forma semanal;

c) seleccionar los cultivos del paso b) cuando la tasa de crecimiento alcanza el valor inicial;

d) subcultivar en forma continua las células en medios selectivos que contienen metilamina, realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento, y mutagenizar en forma semanal hasta que la tasa de crecimiento en presencia de metilamina alcanza la correspondiente a los medios selectivos sin metilamina;

e) aislar las colonias individuales del paso d) mediante plaqueo sobre medios selectivos que contienen metilamina, cultivar dichas colonias, y seleccionar las colonias grandes y de rápido crecimiento;

f) evaluar las colonias seleccionadas del paso e) en cuanto a su capacidad para degradar L-asparagina bajo condiciones no inductoras, y seleccionar al menos una colonia con actividad de degradación de L-asparagina alta en comparación con las células al inicio del paso d);

g) repetir los pasos d) a f), incrementando la concentración de metilamina cada vez que se repiten, hasta que la actividad de degradación de L-asparagina alcanza una meseta;

h) aislar la cepa del paso g) en el cual la actividad de degradación de L-asparagina ha alcanzado una meseta.

6. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque la asparaginasa asociada a la pared celular es codificada por el locus *ASP3*.

7. El método de la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque la cepa de levadura de tipo natural es levadura de panadería.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado porque la mutagénesis es mutagénesis física o mutagénesis química.

9. El método de la reivindicación 8, caracterizado porque la mutagénesis física es mutagénesis con UV.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, caracterizado porque el período de tiempo desde el paso a) hasta el paso c) es de 2 a 4 semanas.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, caracterizado porque el período de tiempo desde el paso d) hasta el paso g) es de 6 a 48 semanas.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, caracterizado porque las colonias se cultivan durante un período de 2 a 10 días en el paso e) antes de seleccionar las colonias grandes y de rápido crecimiento.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, caracterizado porque, en el paso g), la metilamina se incrementa lentamente en forma semanal.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, caracterizado porque, en el paso g), la metilamina se incrementa desde 0.05 g/L hasta 12 g/L.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, caracterizado porque la metilamina en el paso e) es una cantidad suficiente para inhibir la tasa de crecimiento en un porcentaje del 25 al 75% respecto de la tasa de crecimiento en los medios selectivos sin metilamina.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, caracterizado porque el paso de realizar el seguimiento de la tasa de crecimiento comprende medir la densidad óptica de las células o medir el tamaño de colonia de las células cultivadas en medios selectivos.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, caracterizado porque el número de repeticiones en el paso g) es de 5 a 20.

18. Una levadura aislada caracterizada porque es producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 17.

19. Una cepa de levadura aislada, caracterizada porque fue depositada ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) bajo el número de acceso 140515-01 (RBAR-01).

20. Una cepa de levadura aislada, caracterizada porque fue depositada ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) bajo el número de acceso 140515-02 (RBAR-02).

21. Una cepa de levadura aislada, caracterizada porque fue depositada ante la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) bajo el número de acceso 140515-03 (RBAR-03).

22. Un método para reducir la asparagina durante la preparación o el procesamiento de alimentos, caracterizado porque comprende agregar a los alimentos la cepa de levadura de acuerdo con lo

reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 18 a 21, bajo condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos; en donde la levadura reduce la asparagina durante la preparación o el procesamiento de los alimentos.

23. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque la cepa de levadura es una cepa inactiva.

24. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque la cepa de levadura es una cepa fresca.

25. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque la cepa de levadura es levadura seca activa.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, caracterizado porque el producto alimenticio es un producto alimenticio a base de verduras, una bebida, un producto de panadería, un producto cereal, una fruta, legumbre, un producto lácteo o un producto cárnico.

27. El método de la reivindicación 26, caracterizado porque el paso de agregar la cepa de levadura a los alimentos bajo condiciones de preparación o procesamiento de alimentos comprende reemplazar un ingrediente de levadura con la cepa de levadura.

28. El método de la reivindicación 26, caracterizado porque el paso de agregar la cepa de levadura a los alimentos bajo condiciones de preparación o procesamiento de los alimentos comprende fermentación.

29. El método de la reivindicación 26, caracterizado porque el producto alimenticio es una papa o un producto a base de papa.

30. El método de la reivindicación 29, caracterizado porque el paso de agregar la cepa de levadura a los alimentos bajo condiciones de preparación o procesamiento de alimentos comprende remojar

previamente la papa o el producto a base de papa en una mezcla de agua y la cepa de levadura antes de la cocción.

31. El método de la reivindicación 26, caracterizado porque la bebida es café.

32. El método de la reivindicación 31, caracterizado porque el paso de agregar la cepa de levadura a la preparación o el procesamiento de alimentos comprende remojar granos de café en extracto de granos de café que ha sido tratado previamente con la cepa de levadura para reducir la asparagina de tal modo que el extracto pre-tratado agote la asparagina de los granos de café antes de tostarlos.

33. Un producto alimenticio que tiene una concentración reducida de asparagina o acrilamida, caracterizado porque es producido usando la cepa de levadura de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 18 a 21.

34. Un producto alimenticio que tiene una concentración reducida de asparagina o acrilamida, caracterizado porque es producido usando el método de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 32.